

## 副溶血性弧菌分离鉴定方法的改进(I)

卫生部食品卫生监督检验所 唐细良

导师:周桂莲 刘宏道

副溶血性弧菌为引起食物中毒的主要病原菌之一。自五十年代日本首次发现此菌以来,该菌已引起各国学者高度重视,研究成果甚多,尤其是对其耐盐性及是否分解蔗糖产酸等生物学特性有了全面、深入的认识。普遍认为蔗糖与耐盐性不能作为区分该菌与溶藻性弧菌的绝对指标<sup>[1]</sup>。若仅根据蔗糖阴性挑选可疑菌落,则将漏掉蔗糖阳性的副溶血性

弧菌。另外,已有的分离、鉴定副溶血性弧菌的常规方法均耗时较长,在紧急情况下,不能及时给卫生监督人员及临床大夫提供实验室诊断依据。本着减少漏诊,达到准确、相对快速、简便的目的,本文对该菌的分离鉴定方法进行了研究。

### 1. 材料与方法

表1 细菌在不同氯化钠浓度中生长情况(菌量:亿/ml)

菌株	3.5% NaCl			7% NaCl			8% NaCl		
	4hr	12hr	22hr	4hr	12hr	22hr	4hr	12hr	22hr
副溶血性弧菌									
142③	1	11	>20	0.1	9	>20	1	8	>20
78②	3	15	>20	2	11	>20	1.5	9	20
102	6	10	20	3	8	17	1	4	15
90②	14	20	>20	8	17	>20	5	10	20
90①	19	>20	>20	11	20	>20	7	15	>20
556	10	20	>20	7	17	>20	5	15	>20
吴××	4	16	>20	1	12	>20	<1	10	>20
溶藻性弧菌									
166	15	>20	>20	11	>20	>20	8	>20	>20
河弧菌	3	15	>20	<1	11	>20	0	9	20
非O1弧菌	1	9	20	0	0	0	0	0	0
梅契尼可夫弧菌	1	15	>20	<1	11	>20	<1	10	>20
创伤弧菌	<1	<1	1	0	0	0	0	0	0
拟态弧菌	1	6	10	0	0	0	0	0	0

1.1 菌株来源:从上海市食检所购进日本标

准副溶血性弧菌10株。从本室保存菌种中,

筛选出副溶血性弧菌 25 株,溶藻性弧菌 5 株,大肠杆菌 2 株,沙门氏菌 3 株,肺炎克雷伯氏菌、产气杆菌各 1 株。从流行病学研究所弧菌研究室得到河弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、非 O1 弧菌、梅契尼可夫弧菌各 1 株。

1.2. 方法:标准 V-P、甲基红、葡萄糖产酸及七叶甙试验方法。采用对照研究的方法,对上述 4 种方法进行改良。

1.2.1 初筛及增菌液中氯化钠浓度的确定

根据文献资料<sup>[2][3]</sup>,选定 PH8.0,温度 37℃,蛋白胨 2%。既适合副溶血性弧菌生长,又尽可能大地抑制其它嗜盐菌生长的氯化钠浓度为理想浓度。

由表 1 可知,副溶血性弧菌在 7%、8% 氯化钠浓度下均能生长较好,但有文献报道<sup>[4]</sup>,有的副溶血性弧菌不能耐受 8% 氯化钠。在 7% 氯化钠碱性蛋白胨水中,副溶血性弧菌经 37℃ 增菌 4 小时,菌量已足够多,而创伤弧菌、拟态弧菌,非 O1 弧菌不能生长,并经 3.5% 氯化钠琼脂平板划线证实,37℃,24 小时亦无菌生长。故选用 7% 氯化钠碱性蛋

白胨水作为副溶血性弧菌初筛及增菌培养液。

1.2.2 鉴别性培养基的研制

根据试验原理,结合大量文献资料<sup>[2][5]</sup>,拟定出如下配方:

1. 蔗糖培养基:2%蛋白胨,0.2%酵母浸膏,3.5%氯化钠,2%蔗糖,0.003%溴麝香草酚蓝,琼脂 1.5%,蒸馏水 100ml,PH8.0。

2. 七叶甙培养基:2%蛋白胨,0.2%酵母浸膏,3.5%氯化钠,0.1%七叶甙,0.2%枸橼酸铁,琼脂 1.5%,蒸馏水 100ml,PH8.0。

3. 葡萄糖培养基:2%蛋白胨,0.2%酵母浸膏,3.5%氯化钠,1%葡萄糖,1.5%琼脂,蒸馏水 100ml,PH8.0。经 8-10 磅灭菌 20 分钟,冷却至 50℃ 左右,倾注平皿,即形成鉴别性平板。

由表 2 可知,副溶血性弧菌在以上三种鉴别性培养基上生长情况均较目前通用的 BTB 选择性培养基好,菌落大小差异有明显的统计学意义。

表2 副溶血性弧菌在不同培养基上生长情况(菌落大小:mm)

菌株	蔗糖培养基(1)		V-P培养基(2)		七叶甙培养基(3)		BTB培养基(4)	
	14hr	18hr	14hr	18hr	14hr	18hr	14hr	18hr
	$\bar{X} \pm S$							
20513	1.01±0.12	1.44±0.07	1.10±0.11	1.48±0.04	1.15±0.05	1.52±0.04	0.94±0.05	1.33±0.05
20533	1.00±0.12	1.45±0.07	1.09±0.09	1.46±0.05	1.14±0.05	1.53±0.05	0.93±0.05	1.34±0.05
20529	1.03±0.13	1.46±0.05	1.10±0.09	1.48±0.06	1.14±0.05	1.51±0.06	0.93±0.05	1.34±0.08
20511	1.01±0.07	1.45±0.08	1.11±0.09	1.47±0.05	1.13±0.07	1.50±0.07	0.94±0.05	1.36±0.05
20527	1.00±0.08	1.46±0.07	1.12±0.08	1.46±0.05	1.11±0.06	1.52±0.06	0.96±0.05	1.36±0.07
20535	1.01±0.10	1.46±0.05	1.09±0.07	1.47±0.05	1.09±0.07	1.51±0.07	0.95±0.05	1.37±0.05
20510	1.03±0.09	1.47±0.08	1.07±0.08	1.48±0.04	1.15±0.05	1.50±0.07	0.95±0.05	1.38±0.06
20530	1.02±0.09	1.46±0.07	1.11±0.07	1.47±0.05	1.13±0.05	1.49±0.06	0.94±0.07	1.37±0.07
20512	1.01±0.09	1.46±0.07	1.10±0.08	1.45±0.07	1.13±0.05	1.49±0.09	0.96±0.07	1.37±0.08
20532	1.02±0.09	1.46±0.05	1.11±0.09	1.46±0.07	1.14±0.05	1.50±0.07	0.95±0.08	1.34±0.05
14hr (1),(4) T=14.3190,P<0.001 (2),(4) T=27.72,P<0.001 (3),(4) T=27.45,P<0.001								
18hr (1),(4) T=16.8415,P<0.001 (2),(4) T=17.8771,P<0.001,(3),(4) T=21.9796,P<0.01								

形态特征:肉眼:BTB 平板上:菌落呈圆形、光滑、有光泽、隆起、边缘整齐、无粘性,蓝

1.2.3 改进的副溶血性弧菌分离鉴定方法  
诊断标准及操作步骤:

1.2.3.1 副溶血性弧菌诊断标准:

1.2.3.2 形态特征: A: 肉眼: 菌落呈圆形、光滑、隆起、有光泽、边缘整齐, 约 1.5mm 大小, 七叶甙、葡萄糖及蔗糖鉴别性平板上分别为黑色(或灰黑色)、无色、蓝色(或黄色)无粘性。 B: 镜检: 革兰氏染色阴性, 细菌呈弧状, 杆状、棒状、逗点状等多形态, 大小不一。

1.2.3.3 耐盐性: 3.5%、7%氯化钠阳性, 9%的氯化钠阳性或阴性, 11%氯化钠阴性。

1.2.1.3. 生化指标: 七叶甙、葡萄糖、赖氨酸脱羧酶、氧化酶均为阳性, V-P 试验、精氨酸二氢酶均为阴性, 蔗糖、阿拉伯胶糖为阳性或阴性。

1.2.3.4 42℃能生长。

1.2.3.5 神奈川现象为阳性或阴性。

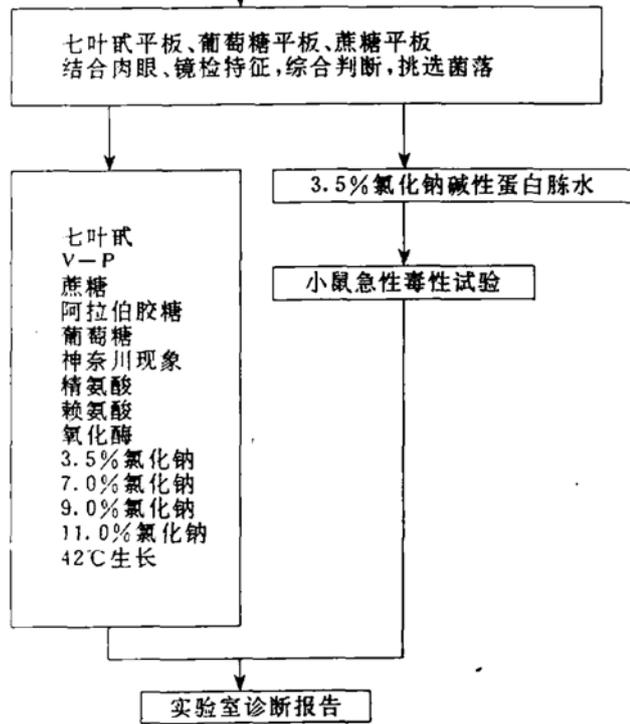
1.2.3.6 小鼠急性毒性试验: 在 2-3 天内试验鼠部分或全部死亡。

完全符合上述特征者, 确诊为副溶血性弧菌, 仅个别指标不符者, 则根据综合判断原则, 实验室诊为副溶血性弧菌可能性大, 并注明不典型生化或其它指标。

1.2.4 副溶血性弧菌分离鉴定方法操作步骤:

2. 改进方法对标准株的检验结果

2.1 形态特征: 肉眼: 葡萄糖平板上, 副溶血性弧菌形成圆形、光滑、透亮、隆起、无色、边缘整齐、约 1.5mm 大小的菌落, 无粘性。七叶甙平板上形成黑色或灰黑色菌落, 余特点同上。蔗糖平板上菌落呈蓝色, 余特点同上。而溶藻性弧菌在葡萄糖、七叶甙、蔗糖平板上



镜检: 副溶血性弧菌革兰氏染色阴性, 呈弧状、杆状、棒状、逗点状、点状等多形态, 大小粗细不一致。

2.2 生化及耐盐性特点: 由表 3 可知, 根据诊断标准, 无 1 株副溶血性弧菌漏检; 亦无 1 株其它弧菌被诊为副溶血性弧菌。

3 副溶血性弧菌的初步诊断标准:

该菌引起的食物中毒病人, 大多发病急, 且有时中毒人数很多, 若能很快提供较准确的实验室诊断依据, 意义较大。本课题的主要目的之一就是试图使分离与初步鉴定很好地结合起来。根据标准株实验结果, 拟定出如下标准:

3.1 样品中存在有副溶血性弧菌: 经 7%氯化钠碱性蛋白胨水于 37℃ 存放 4 小时, 分别接种到七叶甙、蔗糖、葡萄糖平板上, 37℃ 存

表3 弧菌特性

菌株数	耐盐性试验(%)				氧化酶	V P	七 叶 貳	阿拉 伯 糖	葡 萄 糖	蔗 糖	K P	42℃ 生长	精 氨酸	赖 氨酸	
	3.5	7	9	11											
	+/-	+/-	+/-	+/-											
副溶血性弧菌	21	21/0	21/0	19/2	0/21	21/0	0/21	21/0	20/1	21/0	1/20	19/2	21/0	0/21	21/0
溶藻性弧菌	5	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	0/5	0/5	5/0	5/0	0/5	5/0	0/5	5/0
河弧菌	1	1/0	1/0	0/1	0/1	1/0	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	0/1	1/0	1/0	0/1
创伤弧菌	1	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1	0/1	1/0	1/0	0/1
拟态弧菌	1	1/0	1/0	0/1	0/1	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	0/1	0/1	1/0	0/1	1/0
非O1弧菌	1	1/0	0/1	0/1	0/1	1/0	1/0	0/1	0/1	1/0	1/0	0/1	1/0	1/0	0/1
梅契尼可夫弧菌	1	1/0	1/0	1/0	1/0	0/1	1/0	0/1	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	0/1

注：+/-：示阳性/阴性。余同。

放 14—18 小时,三种平板上依次可见黑色(或灰黑色)、蓝色、无色、有光泽菌落,均为圆形、光滑、隆起、边缘整齐、无粘性;葡萄糖平板上典型菌落为 V—P 试验阴性。镜检:革兰氏染色为阴性,多形态,最理想情况为从上述三种平板上挑起的典型菌落镜下形态完全一致或基本上一致。

3.2 样品中很可能存在有副溶血性弧菌:上述三种鉴别性平板中有两种平板上菌落特征与上述完全相符,仅有一种平板上菌落特征不完全符合。

3.3 样品中可能存在有副溶血性弧菌:上述三种鉴别性平板中仅有一种平板上存在典型特征性菌落。

#### 4. 讨论

4.1 7%氯化钠碱性蛋白胨水为理想的增菌及初筛液。耐盐性为副溶血性弧菌最大的生物学特性,充分利用此特性,就能获得满意的分离及增菌效果。

4.2 分离与初步鉴定结合起来,既能提高检出率,又能及时提供比较准确的实验室诊断

似或完全一致。样品中细菌经初筛及增菌后,副溶血性弧菌数量已够多,无疑能同时接种至上述三种鉴别性平板上。根据七叶貳阳性、V—P 试验阴性、蔗糖阴性,能耐受 7%氯化钠,结合肉眼、镜检特征,不难理解在 18—22 小时内能够作出比较准确的初步诊断。

#### 5. 结论

5.1 通过实验证明,7%的氯化钠碱性蛋白胨水为副溶血性弧菌理想的分离及初筛液。

5.2 将七叶貳、蔗糖、葡萄糖三种鉴别性平板联合起来,无 1 株标准副溶血性弧菌漏检,且能在 18—22 小时内作出比较准确的初步诊断。

5.3 改进的副溶血性弧菌分离鉴定方法从样品中检出副溶血性弧菌需时 46—48 小时,包括动物试验共需时间 4—5 天。

#### 参 考 文 献

[1]朱曜. 食品病原微生物检验技术. 1987: 88—91.  
 [2]Toshio Miwatani, et al vibrio parahaemolyticus: A causative Bacterium of Food Poisoning saikon publishing co: LTD • TOKYO, 1976: 101—104  
 [3]Robert M. Twedt, Rose Mary E. movelli. modified

弧菌,无疑,漏检率将减少。又由于上述二种鉴别性平板培养基成份基本一致,相同细菌在上述三种平板上肉眼及镜检特征可能很相

[6]Henri L. Gram Negative Bacteria of Medical and public Health Importance; Taxonomy I Identification Application. Inserm/1982; 114: 185—197.